

日 本 国 特 許 庁

24.02.03

JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2002年 2月22日

出 願 番 号

Application Number:

特願2002-047021

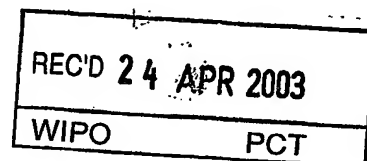
[ST.10/C]:

[JP2002-047021]

出 願 人

Applicant(s):

呉羽化学工業株式会社



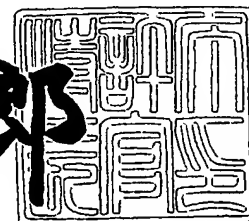
**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 4月 1日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田 信一郎



Best Available Copy

出証番号 出証特2003-3022317

【書類名】 特許願

【整理番号】 KRH025903P

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 35/00

【発明者】

    【住所又は居所】 宮城県仙台市青葉区広瀬町 2 - 1 2

    【氏名】 海老名 卓三郎

【発明者】

    【住所又は居所】 埼玉県所沢市大字上新井 9 8 9 - 1 7

    【氏名】 松永 謙一

【特許出願人】

    【識別番号】 000001100

    【氏名又は名称】 呉羽化学工業株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100090251

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 森田 憲一

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 017813

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 図面 1

    【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規免疫増強剤

【特許請求の範囲】

【請求項1】 マツタケFERM BP-7304株の菌糸体の熱水抽出液と、前記菌糸体熱水抽出液を得る際に残留する菌糸体残渣のアルカリ溶液抽出液とを混合して得られる混合液の陰イオン交換樹脂吸着画分であって、

(a) フェノール硫酸法によるグルコース換算値としての糖質含量が60～72%であり、

(b) 銅フォリン法によるアルブミン換算値としてのタンパク質含量が28～40%である

前記陰イオン交換樹脂吸着画分を有効成分として含有することを特徴とする、免疫増強剤。

【請求項2】 マツタケFERM BP-7304株の菌糸体の熱水抽出液と、前記菌糸体熱水抽出液を得る際に残留する菌糸体残渣のアルカリ溶液抽出液とを混合して得られる混合液の陰イオン交換樹脂吸着画分であって、

(a) フェノール硫酸法によるグルコース換算値としての糖質含量が60～72%であり、

(b) 銅フォリン法によるアルブミン換算値としてのタンパク質含量が28～40%である

前記陰イオン交換樹脂吸着画分を有効成分として含有することを特徴とする、免疫増強機能性食品。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規の免疫増強剤に関する。本発明の免疫増強剤は、医薬品として投与することができるだけでなく、種々の形態、例えば、機能性食品や健康食品（飲料を含む）、又は飼料として飲食物の形で与えることも可能である。更には、オーラル衛生用組成物、例えば、口中に一時的に含むものの、そのほとんどを口中より吐き出す形態、例えば、歯磨剤、洗口剤、チューインガム、又はうがい

剤の形で与えることも、あるいは、鼻から吸引させる吸入剤の形で与えることも可能である。

## 【0002】

## 【従来の技術】

本発明者は、或る生物製剤（BRM）を原発腫瘍内に投与すると、原発腫瘍のみならず、遠隔転移腫瘍まで治癒させることを、本発明者の一部及びその共同研究者が考案したマウス「二重移植腫瘍系」で明らかにしてきた（Ebina, Biotherapy, 14, 379-394, 2000；海老名ら，癌と化学療法，18, 1812-1816, 1991；Ebinaら，Biotherapy, 12, 495-500, 1998）。すなわち、腫瘍がまだ原発巣しかない場合には、手術して摘出すれば問題ないが、既に遠隔転移巣がある場合（特に、肉眼で観察することができない微小転移巣がある場合）には、手術によって原発巣を摘出すると、転移巣が増殖を開始し、癌治療には結びつかない。すなわち、転移巣の治療が、癌治療の大きな課題と言える。

## 【0003】

従来、薬剤を癌局所に投与することは、癌細胞を散らばすことになり、好ましくないとされてきたが、生物製剤を癌局所に投与すると、癌原発巣のみならず、転移巣まで退縮させることを見出した（Ebinaら，Jpn. J. Cancer Res., 77, 1034-1042, 1986）。その研究を通して、カワラタケ菌糸体から抽出したタンパク質結合多糖体PSKは、原発腫瘍のみならず、遠隔転移巣も治癒させるのに対して、シイタケ子実体から精製したβ-グルカンであるレンチナン（lentinan）では抗腫瘍効果がみられなかった。また、タマサキツツラフジ抽出物であるセファランチン（cepharantin）は、左右腫瘍に抗腫瘍効果が認められた（海老名ら，癌と化学療法，28, 211-215, 2001）が、精製したアルカロイド単品では、抗腫瘍効果が弱かった。

以上の結果から、生物製剤の中でも、西洋医学による精製物ではかえって抗腫瘍効果がなく、有効成分を含む抽出物の方が効果があることがわかり（海老名，癌と化学療法，28, 1515-1518, 2001）、漢方医学の漢方薬のよ

うに、数種類の生薬の混合物とも異なる第三の医学・統合医学の発想に結びついた（海老名，医学のあゆみ，194，690-692，2000）。

## 【0004】

一方、マツタケ [Tricholoma matsutake (S. Ito & Imai) Sing.] には種々の生理活性物質が含まれていることが知られており、例えば、特公昭57-1230号公報及び特許第2767521号明細書には、マツタケに含有される各種の抗腫瘍性物質が開示されている。前記特公昭57-1230号公報には、マツタケ菌糸体の液体培養物を熱水又は希アルカリ溶液で抽出して得られる抽出液から分離精製されたエミタニン-5-A、エミタニン-5-B、エミタニン-5-C、及びエミタニン-5-Dに、サルコーマ180細胞の増殖阻止作用があることが開示されている。また、前記特許第2767521号明細書には、マツタケ子実体の水抽出物から分離精製された分子量20～21万のタンパク質（サブユニットの分子量＝10～11万）が抗腫瘍活性を有することが開示されている。

更に、本発明者は、マツタケ熱水抽出液、マツタケのアルカリ溶液抽出液、あるいは、マツタケ熱水抽出液又はマツタケアルカリ溶液抽出液の陰イオン交換樹脂吸着画分が、免疫増強活性を有することを既に見出している（W001/49308号公報）。

## 【0005】

本発明者は、免疫増強作用（好ましくは抗腫瘍作用、特には転移巣の治療作用）を有する物質を更に鋭意探索したところ、特定のマツタケ株を特定の培養方法により培養して得られた菌糸体由来の部分精製画分に、このような免疫増強作用があることを新たに見出した。また、この画分が、理化学的性質の点で、公知の画分（例えば、W001/49308号公報に記載の陰イオン交換樹脂吸着画分）と異なる画分であることも見出した。本発明はこのような知見に基づくものである。

## 【0006】

## 【発明が解決しようとする課題】

従って、本発明の課題は、新規の免疫増強剤（好ましくは抗腫瘍剤、特には転

移巢の治療剤)を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明の前記課題は、マツタケ F E R M B P - 7 3 0 4 株の菌糸体の熱水抽出液と、前記菌糸体熱水抽出液を得る際に残留する菌糸体残渣のアルカリ溶液抽出液とを混合して得られる混合液の陰イオン交換樹脂吸着画分であって、

(a) フェノール硫酸法によるグルコース換算値としての糖質含量が 6 0 ~ 7 2 % であり、

(b) 銅フォリン法によるアルブミン換算値としてのタンパク質含量が 2 8 ~ 4 0 % である

前記陰イオン交換樹脂吸着画分を有効成分として含有することを特徴とする、免疫増強剤により解決することができる。

【0008】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の免疫増強剤は、有効成分として、マツタケ F E R M B P - 7 3 0 4 株 [ T r i c h o l o m a m a t s u t a k e ( S . I t o & I m a i ) S i n g . C M 6 2 7 1 ] の菌糸体の熱水抽出液(以下、単に「菌糸体熱水抽出液」と称することがある)と、前記菌糸体熱水抽出液を得る際に残留する菌糸体残渣のアルカリ溶液抽出液(以下、単に「菌糸体残渣アルカリ溶液抽出液」と称することがある)とを混合して得られる混合液(以下、単に「混合抽出液」と称することがある)の陰イオン交換樹脂吸着画分であって、

(a) フェノール硫酸法によるグルコース換算値としての糖質含量が 6 0 ~ 7 2 % (好ましくは 6 2 ~ 7 0 %) であり、

(b) 銅フォリン法によるアルブミン換算値としてのタンパク質含量が 2 8 ~ 4 0 % (好ましくは 3 0 ~ 3 8 %) である

前記混合抽出液の陰イオン交換樹脂吸着画分を含有する。

【0009】

本発明の免疫増強剤における有効成分である、混合抽出液の陰イオン交換樹脂

吸着画分は、これに限定されるものではないが、例えば、  
 マツタケ FERM BP-7304 株をタンク培養により培養し、菌糸体を得る  
 工程（以下、培養工程と称する）；  
 得られたマツタケ FERM BP-7304 株の菌糸体を熱水で抽出して、菌糸  
 体熱水抽出液を得る工程（以下、熱水抽出工程と称する）；  
 熱水で抽出した後の前記菌糸体の残渣を、アルカリ溶液で抽出して、菌糸体残渣  
 アルカリ溶液抽出液を得る工程（以下、アルカリ溶液抽出工程と称する）；  
 前記菌糸体熱水抽出液と前記菌糸体残渣アルカリ溶液抽出液とを混合して得られ  
 る混合抽出液を、陰イオン交換樹脂に吸着させる工程（以下、陰イオン交換樹脂  
 吸着工程と称する）；及び  
 適当な溶離液により吸着画分を溶出する工程（以下、溶出工程と称する）  
 を含む製造方法により、調製することができる。

## 【0010】

培養工程に用いる前記マツタケ FERM BP-7304 株（国際出願第 PCT/JPO1/08876 号）は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター〔（旧）工業技術院生命工学工業技術研究所（あて名：〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）〕に平成12年9月14日より寄託しているものである。このマツタケ FERM BP-7304 株は、京都府亀岡市で採取したマツタケ CM6271 株から子実体組織を切り出し、試験管内で培養することにより、菌糸体継代株を得たものであり、呉羽化学工業株式会社生物医学研究所で維持している。

## 【0011】

マツタケ FERM BP-7304 株の子実体の形態は、今関六也・本郷次雄編の「原色日本菌類図鑑」、保育社（大阪）、昭和32年発行、プレート（Plate）9及び26頁記載のマツタケ子実体に合致するものであった。マツタケ FERM BP-7304 株の継代は、エビオス寒天斜面培地で実施することができる。前記菌株の菌糸体を大量培養する場合には、液体培地に摂取し、例えば、静置培養、振とう培養、又はタンク培養により実施することができる。

マツタケ FERM BP-7304 株の菌糸体をエビオス寒天平板培地に接種

すると、白色の菌糸が放射状に密に生育し、大きなコロニーを形成する。走査型電子顕微鏡で観察すると、太さ1～2  $\mu\text{m}$ の枝状の菌糸体が無数に存在し、菌糸体側部に数  $\mu\text{m}$ 程の突起物が時々みられる。なお、マツタケFERM BP-7304株は、もっぱら菌糸体の形状で継代維持又は培養することが可能であるが、子実体の形状となることもある。

【0012】

以下、マツタケFERM BP-7304株の菌学的性質について説明する。

(1) 麦芽エキス寒天培地における培養的・形態的性質

マツタケFERM BP-7304株は、麦芽エキス寒天培地においては、白色の菌糸が放射状に密に生育してコロニーを形成する。接種30日目のコロニー径は約4 cmである。

【0013】

(2) ツアペック寒天培地、サブロー寒天培地、オートミール寒天培地、合成ムコール寒天培地、及びフェノールオキシダーゼ反応検定用培地における培養的・形態的性質

マツタケFERM BP-7304株は、ツアペック寒天培地、サブロー寒天培地、オートミール寒天培地、合成ムコール寒天培地、又はフェノールオキシダーゼ反応検定用培地のいずれの培地においても、接種1ヶ月経過しても菌糸の発育はほとんど見られない。

【0014】

(3) YpSs寒天培地における培養的・形態的性質

マツタケFERM BP-7304株は、YpSs寒天培地においては、白色の光沢を有し、マット状に生育する。接種30日目の生育距離は約5 mmである。

【0015】

(4) グルコース・ドライイースト寒天培地における培養的・形態的性質

マツタケFERM BP-7304株は、グルコース・ドライイースト寒天培地においては、白色の光沢を有し、マット状に生育する。接種30日目の生育距離は約2 mmである。



## 【0016】

## (5) 最適生育温度及び生育の範囲

滅菌処理した液体培地（3%グルコース，0.3%酵母エキス；pH 7.0）10 mLの入った100 mL容三角フラスコに、マツタケFERM BP-7304株の種菌約2 mgを接種し、5～35℃の種々の温度でそれぞれ培養し、28日目にフラスコから菌体を取り出し、蒸留水でよく洗浄した後に乾燥させ、重量を測定した。その結果、菌体重量は5～15℃の範囲で直線的に増加し、15～25℃の範囲で緩やかに増加した。27.5℃以上ではほとんど増殖しなかった。最適生育温度は15～25℃である。

## 【0017】

## (6) 最適生育pH及び生育の範囲

液体培地（3%グルコース，0.3%酵母エキス）のpHを1 mol/L塩酸又は1 mol/L水酸化カリウムで調製して、pHが3.0～8.0の範囲の種々の培地を調製して生育pH値を調べた。各培地をフィルター滅菌し、培地10 mLを滅菌済100 mL容三角フラスコに分注した。マツタケFERM BP-7304株の種菌約2 mgを接種後、22℃で培養し、28日目にフラスコから菌体を取り出し、蒸留水でよく洗浄した後に乾燥させ、重量を測定した。その結果、菌体の生育限界はpH 3.0～7.0の範囲にあり、最適生育pHは4.0～6.0であった。

## 【0018】

## (7) 対峙培養による帯線形成の有無

エビオス寒天平板培地に、マツタケFERM BP-7304株のブロック（約3 mm×3 mm×3 mm）と、公知の13種類のマツタケ株〔例えば、IFO 6915株；（財）発酵研究所〕の各ブロック（約3 mm×3 mm×3 mm）とを、約2 cm間隔に対峙して植菌し、22℃で3週間培養した後、両コロニー境界部に帯線が生じるか否かを判定した。

その結果、マツタケFERM BP-7304株は、公知の13種類のマツタケ株のいずれの株に対しても、明確な帯線を形成しなかった。なお、マツタケでは、異株間対峙培養で帯線は生じないとされており、公知の13種類のマツタケ

株間についても、明確な帯線を形成した組み合わせはなかった。

【0019】

(8) 栄養要求性

滅菌処理した菌根菌用合成培地 (Ohtaら, Trans. Mycol. Soc. Jpn., 31, 323, 1990) 10 mL の入った 100 mL 容三角フラスコに、マツタケ FERM BP-7304 株の種菌約 2 mg を接種し、22℃で培養し、42日目にフラスコから菌体を取り出し、蒸留水でよく洗浄した後乾燥させ、重量を測定したところ、菌体 441 mg が得られた。

【0020】

前記菌根菌用合成培地中の炭素 (C) 源であるグルコースの代わりに、28種類の糖質関連物質のいずれか 1 つを加えた各培地に、マツタケ FERM BP-7304 株を接種して培養し、培養終了後、菌体重量を測定した。

その結果、菌体重量が多かった糖質関連物質から菌体重量が少なかった糖質関連物質を順に示せば、以下のとおりである：

小麦デンプン>トウモロコシデンプン>デキストリン>メチルβグルコシド>セロビオース>マンノース>フラクトース>アラビノース>ソルビトール>グルコース>ラクトース>グリコーゲン>マンニトール>リボース>マルトース>トレハロース>ガラクトース>ラフィノース>メリビオース>N-アセチルグルコサミン。

なお、セルロース、ダルチトール、シュクロース、キシロース、メチルαグルコシド、イヌリン、イノシトール、又はソルボースでは菌の発育はほとんどみられなかった。

【0021】

次に、前記菌根菌用合成培地中の窒素 (N) 源である酒石酸アンモニウムの代わりに、15種類の窒素関連物質のいずれか 1 つを加えた各培地に、マツタケ FERM BP-7304 株を接種して培養し、培養終了後、菌体重量を測定した。

その結果、菌体重量が多かった窒素関連物質から菌体重量が少なかった窒素関連物質を順に示せば、以下のとおりである：

コーンステイアプリカー>大豆ペプトン>ミルクペプトン>硝酸アンモニウム>  
硫酸アンモニウム>酒石酸アンモニウム>炭酸アンモニウム>アスパラギン>リ  
ン酸アンモニウム>塩化アンモニウム>硝酸ナトリウム>肉エキス>酵母エキス  
>カザミノ酸>クロレラ>トリプトーン>硝酸カリウム。

【0022】

更に、前記合成培地中のミネラル及びビタミン類の内、特定一成分を除去した  
培地に、マツタケFERM BP-7304株を接種して培養し、培養終了後、  
菌体重量を測定した。

その結果、塩化カルシウム・二水和物、硫酸マンガン(II)・五水和物、硫酸  
亜鉛・七水和物、硫酸コバルト・七水和物、硫酸銅・五水和物、硫酸ニッケル・  
六水和物、塩酸チアミン、ニコチン酸、葉酸、ビオチン、塩酸ピリドキシン、塩  
化カーニチン、アデニン硫酸・二水和物、又は塩酸コリンのいずれか1つの欠損  
によっては、菌体重量にはほとんど影響なかった。一方、硫酸マグネシウム・七  
水和物、塩化鉄(II)、又はリン酸二水素カリウムのいずれか1つを培地から除  
くと、菌体重量は顕著に減少した。すなわち、マグネシウム、鉄、リン、及びカ  
リウムは、マツタケFERM BP-7304株の増殖に必須と考えられる。

【0023】

(9) DNAの塩基組成(GC含量)

マツタケFERM BP-7304株のGC含量は、49.9%である。

【0024】

(10) RAPD法により生成するDNAパターン

6種類の異なるPCR(polymerase chain reaction)用プライマー(10mer)をそれぞれ単独で用いるRAPD(random amplified polymorphic DNA)法により生成する  
DNAパターンについて、マツタケFERM BP-7304株と、公知の44  
種類のマツタケ株[例えば、IFO 6915株；(財)発酵研究所]とを比較  
したところ、マツタケFERM BP-7304株は、44種類のマツタケ株の  
いずれとも異なるDNAパターンを示した。

【0025】

培養工程で用いる培地としては、例えば、グルコース・酵母エキス培地を用いることができる。

前記培地におけるグルコース濃度は、0.01～15%であることが好ましく、1～10%であることがより好ましく、3%であることが特に好ましい。前記培地における酵母エキスの濃度は、0.01～3%であることが好ましく、0.1～0.6%であることがより好ましく、0.3%であることが特に好ましい。前記培地のpHは、2.5～8であることが好ましく、4～7であることが好ましく、6であることが特に好ましい。

#### 【0026】

培養工程における培養温度は、10～26℃であることが好ましく、15～25℃であることがより好ましく、25℃であることが特に好ましい。

培養期間は、1～20週間であることが好ましく、2～10週間であることがより好ましく、10週間であることが特に好ましい。

#### 【0027】

培養により得られた培養物から菌糸体を分離する方法としては、例えば、濾過（例えば、濾布濾過）又は遠心分離を用いることができる。得られた菌糸体は、例えば、蒸留水により十分に洗浄してから、次の熱水抽出工程を実施することが好ましい。また、抽出効率が向上するように、破砕物又は粉体の状態に加工することが好ましい。

#### 【0028】

熱水抽出工程に用いる熱水の温度は、60～100℃であることが好ましく、80～98℃であることがより好ましい。また、抽出の際には、抽出効率が向上するように、攪拌又は振盪しながら実施することが好ましい。抽出時間は、例えば、菌糸体の状態（例えば、破砕物又は粉体の状態に加工した場合にはその加工状態）、熱水の温度、又は攪拌若しくは振盪の有無若しくは条件に応じて、適宜決定することができるが、通常、1～6時間であり、2～3時間であることが好ましい。

熱水抽出の後、適当な分離操作、例えば、遠心分離又は濾過により、菌糸体熱水抽出液と菌糸体残渣とを得ることができる。

## 【 0 0 2 9 】

アルカリ溶液抽出工程に用いるアルカリ溶液としては、特に限定されるものではないが、例えば、アルカリ金属（例えば、ナトリウム又はカリウム）の水酸化物、特に水酸化ナトリウムの水溶液を用いることができる。前記アルカリ溶液のpHは、8～13であることが好ましく、9～12であることがより好ましい。アルカリ溶液抽出は、0～30℃で実施することが好ましく、0～25℃で実施することがより好ましい。抽出時間は、例えば、菌糸体残渣の状態（例えば、破砕物又は粉体の状態に加工した場合にはその加工状態）、アルカリ溶液のpH若しくは温度、又は攪拌若しくは振盪の有無若しくは条件に応じて、適宜決定することができるが、通常、30分間～5時間であり、1～3時間であることが好ましい。

アルカリ溶液抽出の後、適当な分離操作、例えば、遠心分離又は濾過により、菌糸体残渣アルカリ溶液抽出液と菌糸体残渣とを得ることができる。

得られた菌糸体残渣アルカリ溶液抽出液は、中和処理を実施してから、次の陰イオン交換樹脂吸着工程に用いることが好ましい。

## 【 0 0 3 0 】

熱水抽出工程で得られた菌糸体熱水抽出液と、アルカリ溶液抽出工程で得られた菌糸体残渣アルカリ溶液抽出液とを混合して得られる混合抽出液は、不溶物が混在する状態で、そのまま、次の陰イオン交換樹脂吸着工程に用いることもできるが、不溶物を除去してから、あるいは、不溶物を除去し、更に、抽出液中の低分子画分を除去してから、次の陰イオン交換樹脂吸着工程に用いることが好ましい。例えば、不溶物が混在する混合抽出液を遠心分離することにより不溶物を除去し、得られる上清のみを、次の陰イオン交換樹脂吸着工程に用いることができる。あるいは、不溶物が混在する混合抽出液を遠心分離して得られる前記上清を透析し、低分子画分（好ましくは分子量3500以下の画分）を除去してから、次の陰イオン交換樹脂吸着工程に用いることができる。

## 【 0 0 3 1 】

陰イオン交換樹脂吸着工程に用いることのできる陰イオン交換樹脂としては、公知の陰イオン交換樹脂を用いることができ、例えば、ジエチルアミノエチル（

DEAE) セルロース又はトリエチルアンモニオエチル (TEAE) セルロースを挙げることができる。

【0032】

溶出工程に用いる溶離液は、陰イオン交換樹脂吸着工程に用いる陰イオン交換樹脂の種類に応じて適宜決定することができ、例えば、塩化ナトリウム水溶液などを挙げることができる。

【0033】

溶出工程により溶出される画分は、そのまま、本発明の免疫増強剤の有効成分として用いることができるが、通常、溶離液に由来する塩を含有するので、それを除去するために、更に透析を実施することが好ましい。

【0034】

本発明の免疫増強剤における有効成分である、混合抽出液の陰イオン交換樹脂吸着画分は、以下に示す理化学的性質を有する。

【0035】

- (1) 糖質含量：フェノール硫酸法によるグルコース換算値として60～72% (好ましくは62～70%) である。
- (2) タンパク質含量：銅フォリン法によるアルブミン換算値として28～40% (好ましくは30～38%) である。
- (3) 糖組成：グルコース61  $\mu\text{g}/\text{mg}$ 、マンノース3.3  $\mu\text{g}/\text{mg}$ 、及びガラクトース2.0  $\mu\text{g}/\text{mg}$  である。

【0036】

- (4) アミノ酸組成：アスパラギン酸及びアスパラギン10.35mol%、トレオニン5.83mol%、セリン6.27mol%、グルタミン酸及びグルタミン10.49mol%、グリシン8.55mol%、アラニン9.19mol%、バリン6.88mol%、1/2-シスチン0.60mol%、メチオニン1.49mol%、イソロイシン5.36mol%、ロイシン9.25mol%、チロシン2.55mol%、フェニルアラニン4.05mol%、リシン5.17mol%、ヒスチジン2.18mol%、アルギニン4.44mol%、トリプトファン1.82mol%、及びプロリン5.54mol% である。

【0037】

(5) 等電点：等電点電気泳動法によれば、メインバンドの等電点は5.85付近である。

【0038】

(6)  $^1\text{H}$ -次元NMR分析：図4に示すスペクトル〔測定条件は、後述の実施例4(6)・(i)を参照のこと〕を示す。

(7) 円偏光二色性分析：図5に示すスペクトル〔測定条件は、後述の実施例4(7)を参照のこと〕を示す。

(8) 旋光度：25℃において690である。

(9) エンドトキシン含量：2.5 ng/mgである。

(10) 赤外分光分析：図6に示すスペクトル〔測定条件は、後述の実施例4(10)を参照のこと〕を示す。

【0039】

本発明の免疫増強剤は、有効成分としての混合抽出液の陰イオン交換樹脂吸着画分を、薬剤学的又は獣医学的に許容することのできる通常の担体又は希釈剤と共に、動物、好ましくは哺乳動物（特にはヒト）に投与することができる。

本発明の免疫増強剤における有効成分である、混合抽出液の陰イオン交換樹脂吸着画分は、免疫増強活性、好ましくは抗腫瘍活性、特には転移巣の治療作用を有する。

従って、本発明における有効成分である、混合抽出液の陰イオン交換樹脂吸着画分は、それ単独で、あるいは、好ましくは薬剤学的又は獣医学的に許容することのできる通常の担体又は希釈剤と共に、免疫増強が必要な対象に、有効量で投与することができる。

また、本発明における有効成分である、混合抽出液の陰イオン交換樹脂吸着画分は、免疫増強用医薬組成物、免疫増強用機能性食品、あるいは、免疫増強用のオーラル衛生用組成物を製造するために使用することができる。

【0040】

本発明の免疫増強剤の投与剤型としては、特に限定がなく、例えば、散剤、細粒剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、懸濁液、エマルジョン剤、シロップ剤、エキ

ス剤、若しくは丸剤等の経口剤、又は注射剤、外用液剤、軟膏剤、坐剤、局所投与のクリーム、若しくは点眼薬などの非経口剤を挙げることができる。

#### 【0041】

これらの経口剤は、例えば、アルギン酸ナトリウム、澱粉、コーンスターチ、白糖、乳糖、ぶどう糖、マンニット、カルボキシメチルセルロース、デキストリン、ポリビニルピロリドン、結晶セルロース、大豆レシチン、ショ糖、脂肪酸エステル、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ポリエチレングリコール、ケイ酸マグネシウム、無水ケイ酸、又は合成ケイ酸アルミニウムなどの賦形剤、結合剤、崩壊剤、界面活性剤、滑沢剤、流動性促進剤、希釈剤、保存剤、着色剤、香料、矯味剤、安定化剤、保湿剤、防腐剤、又は酸化防止剤等を用いて、常法に従って製造することができる。

#### 【0042】

非経口投与方法としては、注射（皮下、静脈内等）、又は直腸投与等が例示される。これらのなかで、注射剤が最も好適に用いられる。

例えば、注射剤の調製においては、有効成分の他に、例えば、生理食塩水若しくはリンゲル液等の水溶性溶剤、植物油若しくは脂肪酸エステル等の非水溶性溶剤、ブドウ糖若しくは塩化ナトリウム等の等張化剤、溶解補助剤、安定化剤、防腐剤、懸濁化剤、又は乳化剤などを任意に用いることができる。

また、本発明の免疫増強剤は、徐放性ポリマーなどを用いた徐放性製剤の手法を用いて投与してもよい。例えば、本発明の免疫増強剤をエチレンビニル酢酸ポリマーのペレットに取り込ませて、このペレットを治療又は予防すべき組織中に外科的に移植することができる。

#### 【0043】

本発明の免疫増強剤は、これに限定されるものではないが、混合抽出液の陰イオン交換樹脂吸着画分を、0.01～99重量%、好ましくは0.1～80重量%の量で含有することができる。

本発明の免疫増強剤を用いる場合の投与量は、病気の種類、患者の年齢、性別、体重、症状の程度、又は投与方法などに応じて適宜決定することができ、経口的に又は非経口的に投与することが可能である。



## 【0044】

また、投与形態も医薬品に限定されるものではなく、種々の形態、例えば、機能性食品や健康食品（飲料を含む）、又は飼料として飲食物の形で与えることも可能である。更には、オーラル衛生用組成物、例えば、口中に一時的に含むものの、そのほとんどを口中より吐き出す形態、例えば、歯磨剤、洗口剤、チューインガム、又はうがい剤の形で与えることも、あるいは、鼻から吸引させる吸入剤の形で与えることも可能である。例えば、混合抽出液の陰イオン交換樹脂吸着画分を、添加剤（例えば、食品添加剤）として、所望の食品（飲料を含む）、飼料、歯磨剤、洗口剤、チューインガム、又はうがい剤等に添加することができる。

## 【0045】

## 【実施例】

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

## 【実施例1】

《マツタケFERM BP-7304株の混合抽出液の陰イオン交換樹脂吸着画分の調製》

マツタケFERM BP-7304株菌糸体を、滅菌処理した培地（3%グルコース，0.3%酵母エキス，pH6.0）3.5tの入った7t容培養タンクに接種し、25℃で攪拌しながら4週間培養を行なった。得られた培養物を濾布濾過し、菌糸体を分離した後、蒸留水で十分に洗浄した。

得られた菌糸体の一部（約1kg）に精製水30Lを加えて、98℃の湯浴中で3時間攪拌抽出した。冷却後、遠心分離（8000rpm，30分間）を行ない、上清A<sub>1</sub>を得た。残渣に精製水30Lを加えて、同一条件下で、再度、抽出及び遠心操作を行ない、上清A<sub>2</sub>を得た。

## 【0046】

続いて、上清A<sub>2</sub>を得た後の残渣に、0.5mol/L水酸化ナトリウム水溶液20Lを加え、25℃で1時間攪拌抽出した。遠心分離を行ない、上清B<sub>1</sub>を得た。残渣に1.0mol/L水酸化ナトリウム水溶液を加え、同一条件で、再度、抽出及び遠心操作を行ない、上清B<sub>2</sub>を得た。得られた上清B<sub>1</sub>及び上清B<sub>2</sub>

を合わせた後、 $1.0\text{ mol/L}$  塩酸にて、 $\text{pH}$ を7.0に調整した（以下、上清Bと称する）。

上清 $A_1$ 、上清 $A_2$ 、及び上清Bを合わせて得られた混合液（以下、抽出混合液Mと称する）を透析チューブ（分画分子量＝3500）に入れ、流水中で48時間透析した。透析内溶液を回収し、凍結乾燥機で乾燥し、白色の粉末（約70g）を得た。

#### 【0047】

得られた粉末の一部（10g）を $50\text{ mmol/L}$  トリス塩酸緩衝液（ $\text{pH}$ 7.0）500mLに溶解し、予め同じ緩衝液で平衡化させておいたジエチルアミノエチルセファセル（DEAE Sephacel；ファルマシア社）を充填したカラムを通過させ、素通り画分（非吸着画分）M1を得た。カラムを前記トリス塩酸緩衝液で十分に洗浄した後、 $0.5\text{ mol/L}$  塩化ナトリウム含有 $50\text{ mmol/L}$  トリス塩酸緩衝液（ $\text{pH}$ 7.0）をアプライし、溶出画分（吸着画分）M2を得た。

得られたM1画分及びM2画分を、それぞれ、 $4^\circ\text{C}$ にて注射用蒸留水で48時間透析した後、透析内液を凍結乾燥して粉末を得た。菌糸体（乾燥重量）に対するM1画分及びM2画分の各収量は、それぞれ、7%及び13%であった。

#### 【0048】

##### 【実施例2】

##### 《二重移植腫瘍系による吸着画分M2の評価》

本実施例では、人工転移モデルである二重移植腫瘍系を用いて、実施例1で得られたM2画分の免疫増強作用について評価した。

具体的には、7週齢BALB/c雄マウス（1群7匹；日本エスエルシー社）と、BALB/cマウスと同系のMeth-A線維芽肉腫細胞とを用いて、マウスの右側腹皮内に $2 \times 10^6$ 個のMeth-A細胞を、左側腹皮内に $4 \times 10^5$ 個のMeth-A細胞を同時に移植した。移植後3日目〔右側の大きな腫瘍（原発巣と想定）が指で触れるようになる〕に、実施例1で得られたM1画分又はM2画分5mgを、右側腫瘍内に3日間連続投与し、左側腫瘍（転移巣と想定）及び右側腫瘍の増殖の度合を21日間観察した。なお、対照として、M1画分又はM

2画分の代わりに、生理食塩水を投与した。

【0049】

結果を図1及び図2並びに表1に示す。

図1は、右側腫瘍における腫瘍直径（平均値±標準偏差）の経時的変化を示すグラフであり、図2は、左側腫瘍における腫瘍直径（平均値±標準偏差）の経時的変化を示すグラフである。図1及び図2において、白丸は、対照の結果を示し、黒四角は、M1画分の結果を示し、白三角は、M2画分の結果を示す。

また、表1には、移植後21日経過後の右側腫瘍及び左側腫瘍の各腫瘍直径（平均値±標準偏差、単位＝mm）及び各腫瘍重量（平均値±標準偏差、単位＝g）を示す。

M2画分を投与することにより、対照に比べ、左右の腫瘍増殖を有意に抑制した。その効果は、M2画分を直接注入した右側腫瘍で顕著であったが、非注入の左側腫瘍の増殖をも抑制したことから、免疫（サイトカイン）を介したメカニズムが考えられる。

【0050】

《表1》

	右側腫瘍（ $2 \times 10^6$ 個）		左側腫瘍（ $4 \times 10^5$ 個）	
	腫瘍直径	腫瘍重量	腫瘍直径	腫瘍重量
	（mm±標準偏差）	（g±標準偏差）	（mm±標準偏差）	（g±標準偏差）
対照	23.5±1.7	4.7±1.0	20.3±1.5	3.0±1.0
M1	17.1±1.5	1.8±0.5	17.1±3.4	2.1±1.1
M2	9.7±3.2	0.6±0.4	11.8±2.5	0.7±0.5

【0051】

【実施例3】

《血清IAP値の測定》

本実施例では、M2画分の投与による血清IAP（immunosuppressive acidic protein）値の変化を測定した。血清IAPは、活性化マクロファージにより産生することが知られており、血清IAP値は

マクロファージ活性化の指標となる。

具体的には、BALB/cマウスに、実施例1で調製したM1画分又はM2画分5mgを皮内注射し、経時的に血液を採取し、SRID (single radial immunodiffusion) 法 (J. Clausen 著, 佐々木 賽及び村地孝訳, 「免疫化学的同定法」, 東京化学同人, 18-21, 1973) により血清IAP値を測定した。

#### 【0052】

結果を図3に示す。図3において、白丸は、M1画分の結果を示し、黒丸は、M2画分の結果を示す。

図3に示すように、M2画分投与により、 $430\mu\text{g/mL}$ のIAPの産生が認められた。

#### 【0053】

##### 【実施例4】

##### 《吸着画分M2の理化学的性質の検討》

実施例1で得られたM2画分、及び後述の参考調製例1で得られた市販マツタケの子実体由来のm2画分の理化学的性質を検討した。測定方法及びその結果を以下に示す。

#### 【0054】

##### (1) 糖質の定量

フェノール硫酸法を用いる比色により定量した。M2画分の糖質含量は、グルコース換算値として62%であった。

実施例1の操作を別途、2回繰り返して得られた2種のM2画分について、同様に、フェノール硫酸法を用いる比色により糖質含量を測定したところ、グルコース換算値として69%及び70%であった。

なお、m2画分の糖質含量は、グルコース換算値として35%であった。

更に、ヨウ素呈色反応を実施したところ、M2画分及びm2画分のいずれも陰性であり、デンプンとは性状の異なる糖質が存在すると考えられた。

#### 【0055】

##### (2) タンパク質の定量

銅フォリン法を用いる比色により定量した。M2画分のタンパク質含量は、アルブミン換算値として38%であった。

実施例1の操作を別途、2回繰り返して得られた2種のM2画分について、同様に、銅フォリン法を用いる比色によりタンパク質含量を測定したところ、アルブミン換算値として31%及び30%であった。

なお、m2画分のタンパク質含量は、アルブミン換算値として65%であった。

#### 【0056】

##### (3) 糖質の組成分析

封入管にM2画分1.0mgと2mol/Lトリフルオロ酢酸0.2mLとを入れ、100℃で6時間加水分解した後、エバポレーターで減圧乾固し、残渣を得た。残渣を純水500μLに溶解し、純水で2倍又は10倍希釈した。この溶液50μLに内部標準物質ヘプトース500ngを添加し、カラムTSK-gel Sugar AXGLC-9A 15cm×4.6mmID（東ソー）と検出器分光光度計RF-535（島津製作所）とを装着した高速液体クロマト装置LC-9A（島津製作所）にアプライした。カラム温度は70℃であり、移動相及びその流速は0.5Mホウ酸カリウム緩衝液（pH8.7）及び0.4mL/分であった。ポストカラム標識の条件は、反応試薬として1%アルギニン/3%ホウ酸を用い、流速は0.5mL/分であり、反応温度は150℃であり、検出波長はEX320nm及びEM430nmである。

M2画分の糖組成は、多い方から順に、グルコース61μg/mg、マンノース3.3μg/mg、及びガラクトース2.0μg/mgであった。

また、m2画分の糖組成は、多い方から順に、グルコース12.9μg/mg、ガラクトース12.6μg/mg、マンノース5.6μg/mg、フコース3.5μg/mg、及びキシロース0.4μg/mgであった。

#### 【0057】

##### (4) アミノ酸組成分析

酸加水分解は、以下の手順で実施した。すなわち、封入管にM2画分0.33mgと6mol/L塩酸0.2mLとを入れ、110℃で22時間加水分解した。

後、エバポレーターで減圧乾固し、残渣を得た。残渣を純水0.5 mLに溶解し、その50  $\mu$ Lをアミノ酸分析に用いた。

また、アルカリ加水分解（トリプトファン分析用）は、以下の手順で実施した。すなわち、M2画分0.48 mgをプラスチックチューブに入れた後、可溶性デンプン（Starch Soluble）5 mgを含む1% n-オクチルアルコール-4.2 mol/L水酸化ナトリウム溶液100  $\mu$ Lを加えた。このプラスチックチューブをガラス試験管に入れ、真空封管下、110℃で16時間加水分解した。空冷後、開封し、プラスチックチューブを氷中で冷却し、1.0 mol/L塩酸を添加し、中和した。更に、精製水840  $\mu$ Lを添加して総量1000  $\mu$ Lとし、その50  $\mu$ Lをアミノ酸分析に用いた。

装置は日立L-8500型アミノ酸分析計（日立製作所）であり、ニンヒドリン発色により定量した。

#### 【0058】

アミノ酸組成は、アスパラギン酸及びアスパラギン10.35 mol%、トレオニン5.83 mol%、セリン6.27 mol%、グルタミン酸及びグルタミン10.49 mol%、グリシン8.55 mol%、アラニン9.19 mol%、バリン6.88 mol%、1/2-シスチン0.60 mol%、メチオニン1.49 mol%、イソロイシン5.36 mol%、ロイシン9.25 mol%、チロシン2.55 mol%、フェニルアラニン4.05 mol%、リシン5.17 mol%、ヒスチジン2.18 mol%、アルギニン4.44 mol%、トリプトファン1.82 mol%、及びプロリン5.54 mol%であった。

#### 【0059】

##### （5）等電点分析

M2画分を1 mg/mLに調製し、（イ）M2画分溶液10  $\mu$ Lに純水10  $\mu$ Lを添加したものに、あるいは、（ロ）M2画分溶液20  $\mu$ L（タンパク質量として約1.14  $\mu$ g）に、それぞれ、40%（体積/体積）程度のサッカロースを加え、電気泳動を実施した。電気泳動の条件は以下のとおりである。

ゲル：IEF-PAGE mini（4%，pH3～10；テフコ社）

泳動用緩衝液：（陰極）0.04 mol/L水酸化ナトリウム溶液、（陽極）0

・ 0.1 mol/L リン酸溶液

泳動条件：100Vで30分間泳動を行ない、続いて、300Vで20分間泳動を行ない、更に、500Vで40分間泳動を行なった。

PI マーカー：各バンドが1.35g（ファルマシア）

染色：銀染色

【0060】

メインバンドの等電点は、5.85付近であった。

【0061】

(6) 核磁気共鳴分析 (NMR)

測定条件は以下のとおりである。

(i)  $^1\text{H}$ -一次元NMR測定

M2画分7mgに $\text{D}_2\text{O}$ 800 $\mu\text{L}$ を加え、超音波で約5分間溶解を試みた後、遠心機にかけ、その上澄み部分を測定に使用した。測定条件は以下のとおりである。

測定装置として、UNITY INOVA 600型 (Varian社) を使用し、観測周波数は599.6MHz ( $^1\text{H}$ 核) である。溶媒として $\text{D}_2\text{O}$ 溶液を使用し、濃度は飽和溶液である。基準としてTSP 0.00ppm ( $^1\text{H}$ ) を用い、温度は25℃であり、繰返し時間7.0秒 ( $^1\text{H}$ 核) で積算回数を256回とした。

【0062】

得られたスペクトルを図4に示す。3.0～5.6ppmに糖由来のシグナルが強く観測された。0.5～3.0ppmに観測されたシグナルがアミノ酸の側鎖由来であると考え、糖由来のシグナル強度がアミノ酸由来のシグナル強度よりかなり強いことから、M2画分は構造内に多くの糖を含むことが推定された。また、6.6～7.6ppmに芳香族アミノ酸のNMRシグナルが観測された。

また、 $\alpha$ グルカンの推定含有率は、71%であった。

【0063】

(7) 円偏光二色性分析 (CD)

M2画分約3mgに水を添加し、2mg/mLとした。沈殿が若干あったので、遠心して上澄み部分を測定に使用した。測定条件は以下のとおりである。

測定装置としてJASCO J-500Aを使用し、溶媒として水を使用した。タンパク質濃度は約2mg/mLであり、波長範囲は200～250nmであり、セル長は1mmであり、温度は室温（約23℃）であり、積算回数は8回である条件で測定を実施した。

#### 【0064】

得られたCDスペクトルを図5に示す。CD値（縦軸）は、楕円核（mdeg）で示した。 $\alpha$ ヘリックスなどの規則的な二次構造は若干存在するが、不規則構造が主要な構造と推定された。

#### 【0065】

##### （8）旋光度

25℃で測定したところ、690であった。

#### 【0066】

##### （9）エンドトキシンの定量

市販測定キット（エンドスペース；生化学工業）及びエンドトキシンプリーの器具及び試薬（生化学工業）を用い、LAL（Limulus Amoebocyte Lysate）反応（Ohbayashi T. ら, Clin. Chim. Acta, 149, 55-65, 1985）により、エンドトキシン量を定量した。

すなわち、M2画分を適当な濃度になるように蒸留水に溶解した後、その50 $\mu$ Lをエンドトキシンプリーの96ウェルマイクロプレートに分注した。別のウェルには、蒸留水又はエンドトキシン標準液の希釈系列を同量分注した。次いで、マイクロプレートの各ウェルにLAL溶液（カプトガニ由来試液）50 $\mu$ Lを分注し、37℃で30分間インキュベートし、ジアゾカップリング試液を加え、発色させた後、545nm（対照=630nm）の吸光度を測定した。標準液の検量線から、M2画分のエンドトキシン量を算出したところ、2.5ng/mgであった。

#### 【0067】



# (10) 赤外分光分析

赤外分光分析は、KBr法により実施した。より具体的には、M2画分0.5mgと、KBr粉末15mgとを均質に混合した後、プレスして円盤状に成型し、測定を実施した。

得られたスペクトルを図6に示す。このスペクトルから、M2画分には多糖類が含まれることが示唆された。

【0068】

## 【参考調製例1】

### 《市販マツタケの混合抽出液の陰イオン交換樹脂吸着画分の調製》

市販の長野産マツタケ子実体100gを凍結乾燥して水分を除去した後、粉碎して粉末15gを得た。

以下、出発材料として菌糸体の代わりに、前記子実体粉末を用いること以外は、実施例1の抽出及び分画操作を繰り返すことにより、非吸着画分m1及び吸着画分m2を得た。

【0069】

## 【発明の効果】

本発明の免疫増強剤によれば、免疫増強が必要な対象の免疫能を増強することができ、例えば、癌の治療、特には転移巣の治療に有効である。

## 【図面の簡単な説明】

### 【図1】

二重移植腫瘍系における右側腫瘍の腫瘍直径（平均値±標準偏差）の経時的変化を示すグラフである。

### 【図2】

二重移植腫瘍系における左側腫瘍の腫瘍直径（平均値±標準偏差）の経時的変化を示すグラフである。

### 【図3】

M1画分又はM2画分の投与による血清IAP量の経時的変化を示すグラフである。

### 【図4】

吸着画分M2の $^1\text{H}$ 一次元NMR測定により得られたスペクトルである。

【図5】

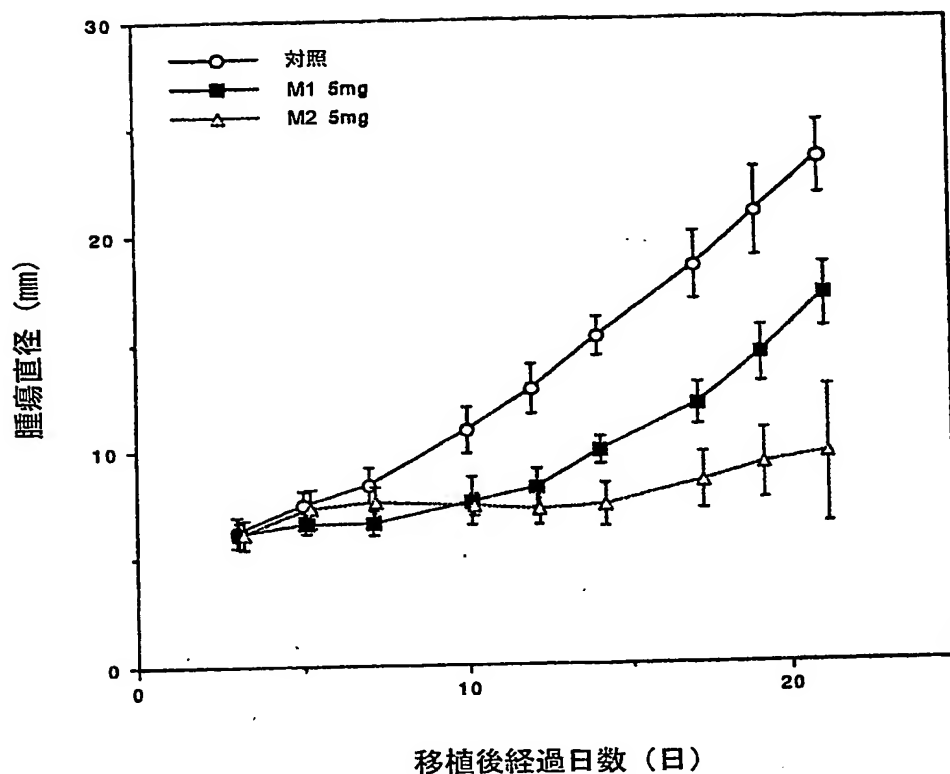
吸着画分M2の円偏光二色性分析により得られたCDスペクトルである。

【図6】

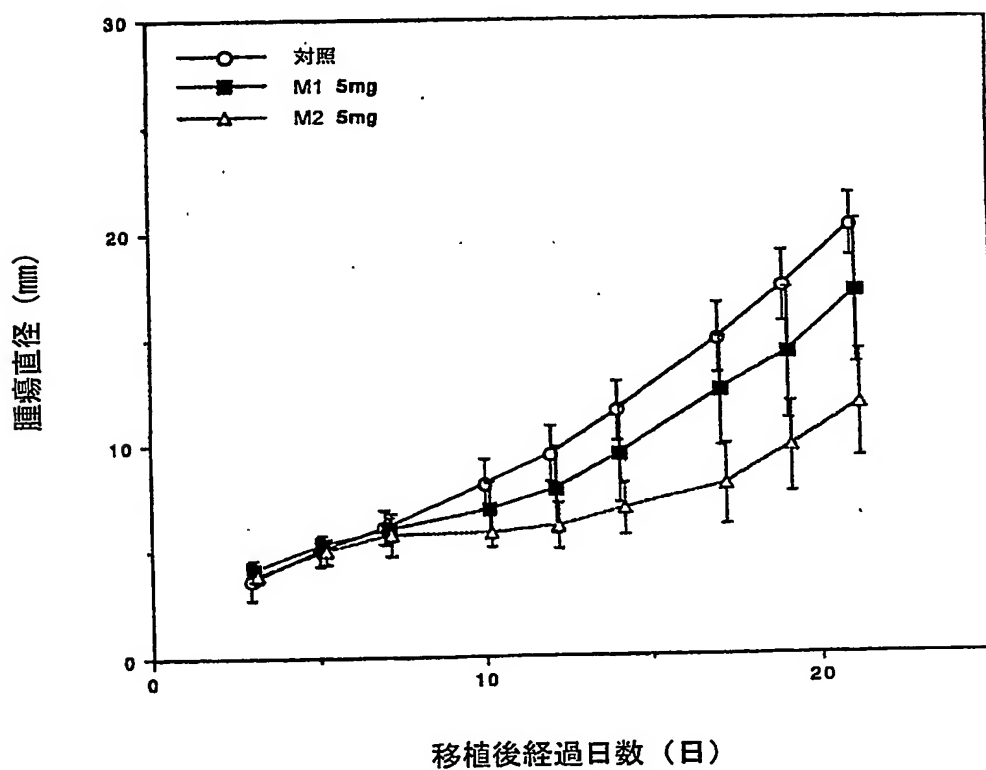
吸着画分M2の赤外分光分析により得られたスペクトルである。

【書類名】 図面

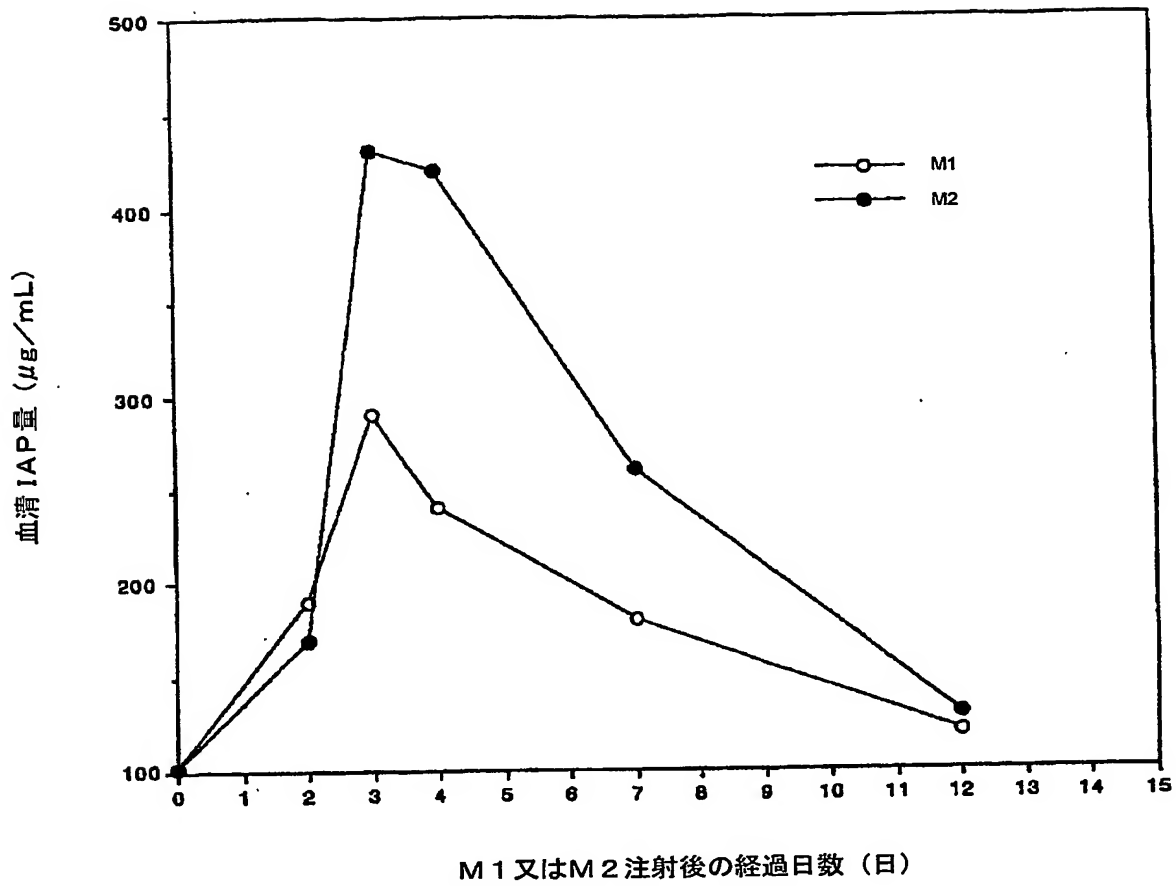
【図1】



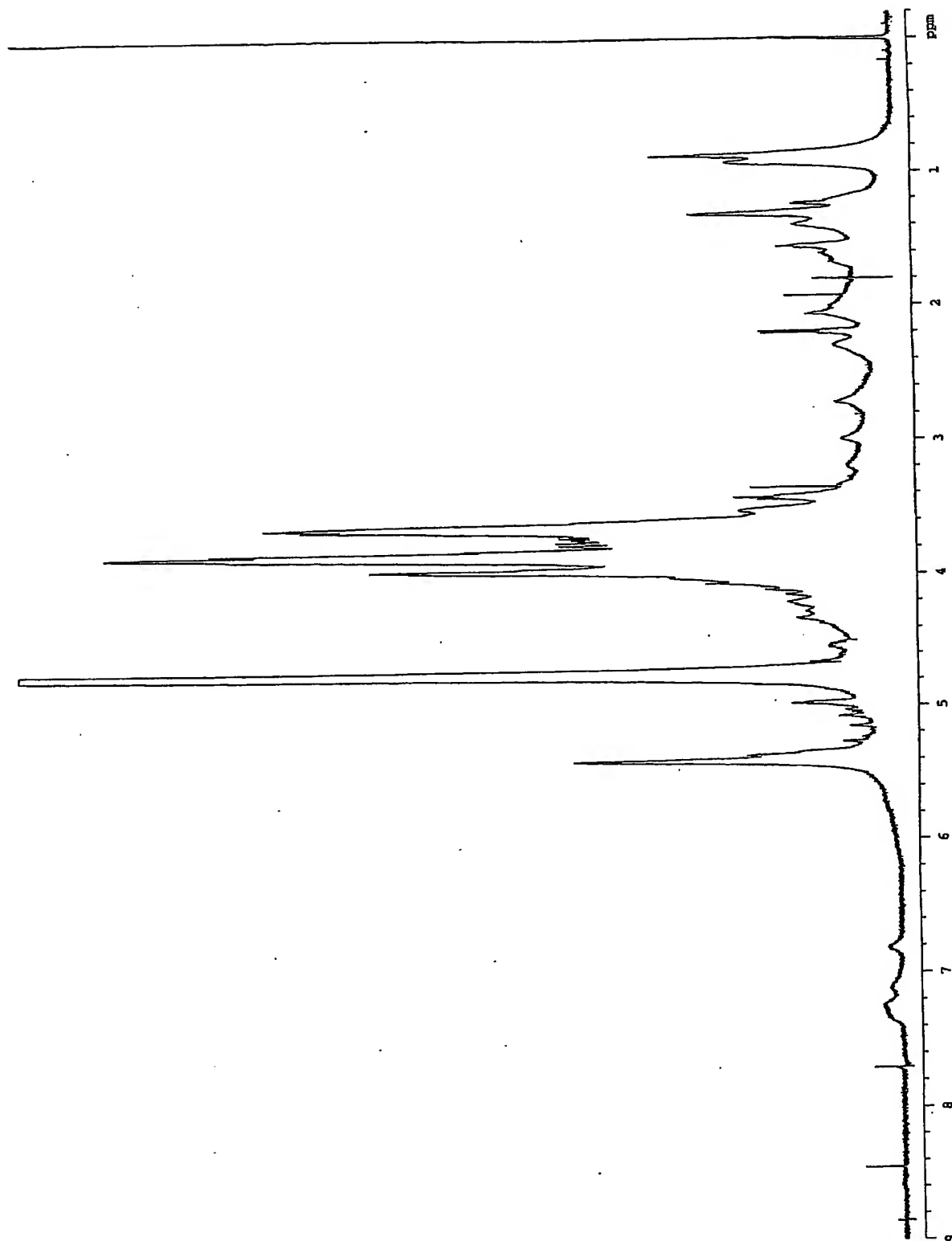
【図2】



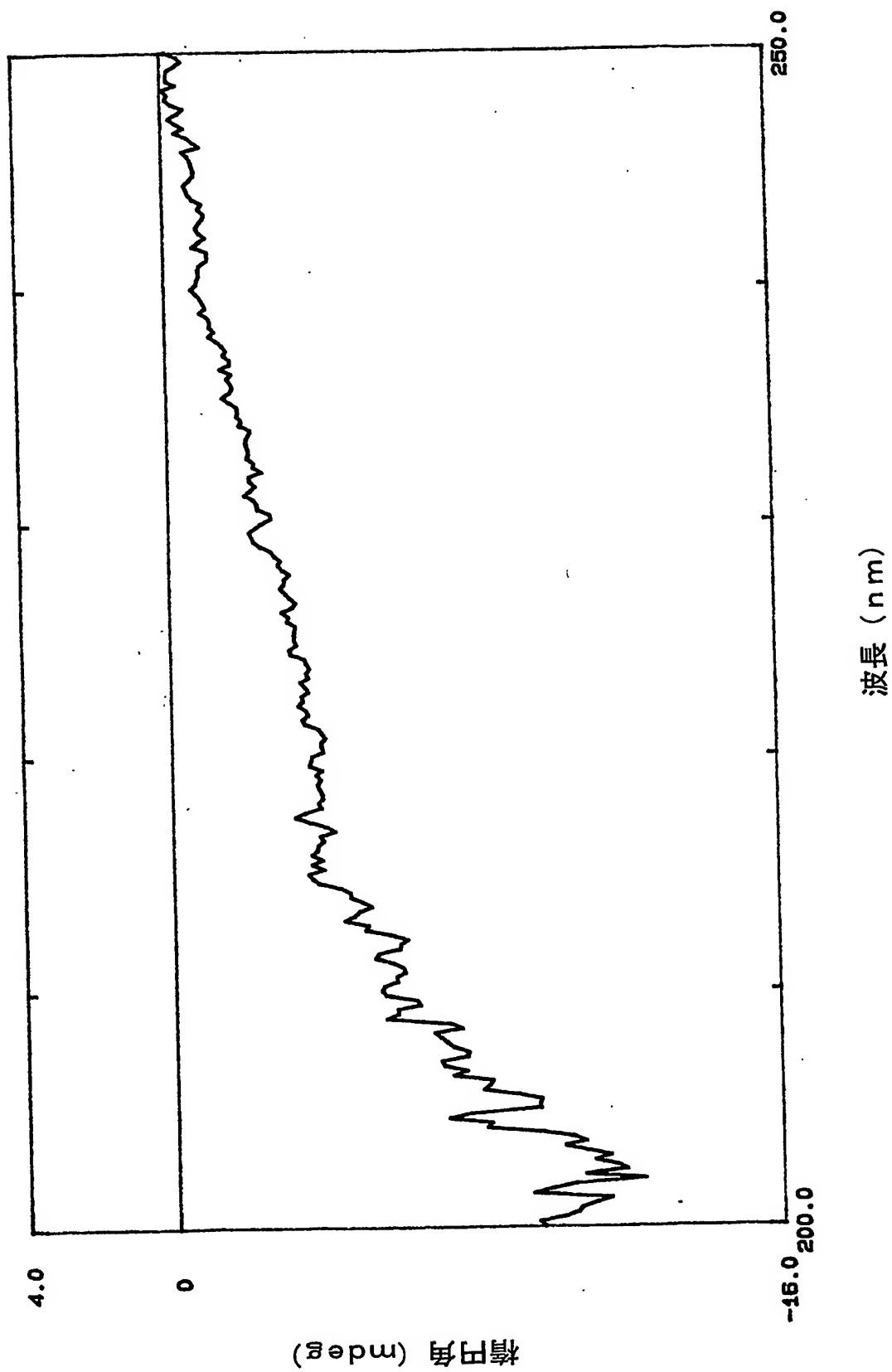
【図3】



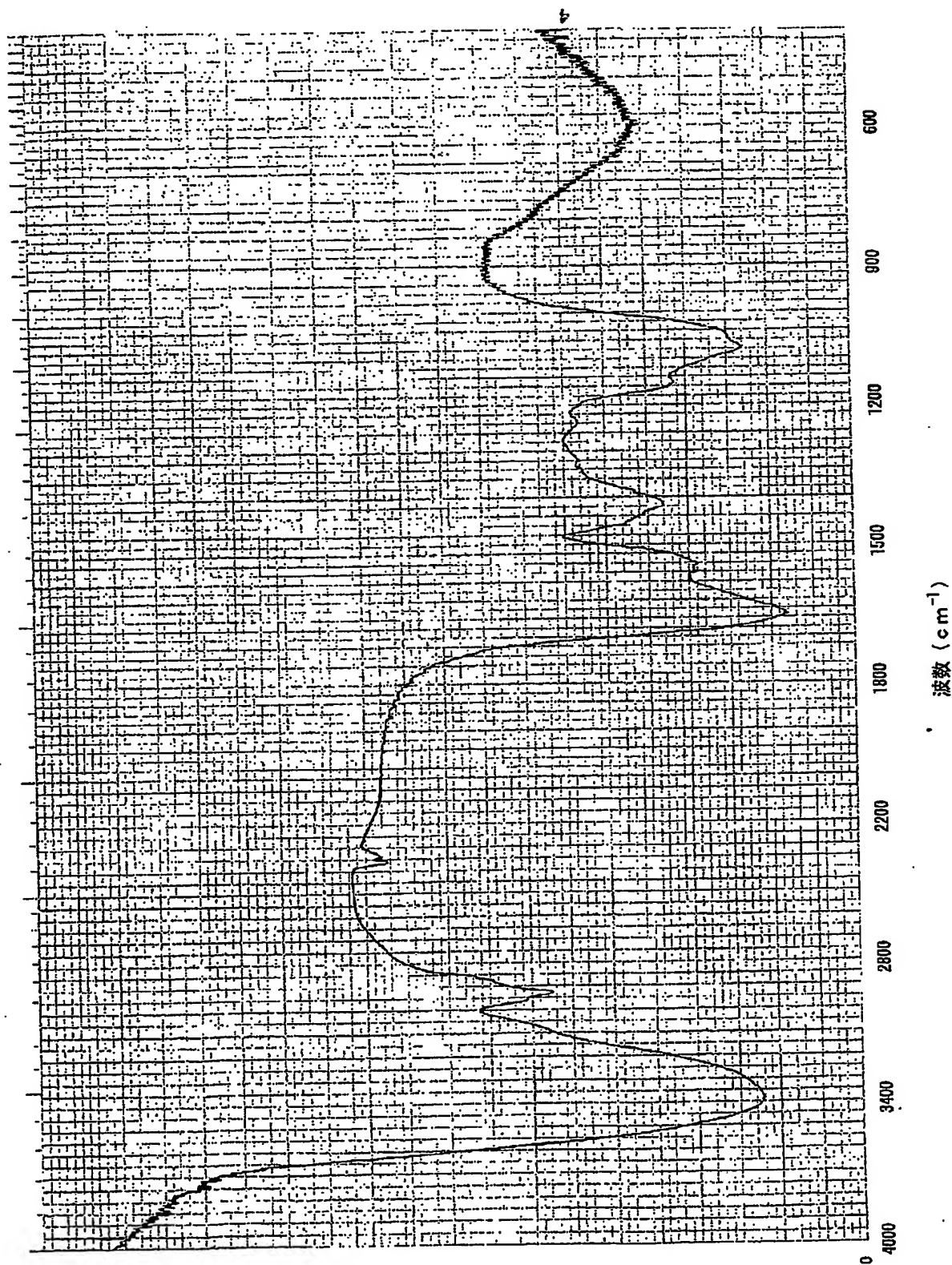
【図4】



【図 5】



【図6】



Best Available Copy 100% 複製

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規の免疫増強剤を提供する。

【解決手段】 有効成分として、マツタケ F E R M B P - 7 3 0 4 株の菌糸体の熱水抽出液と、前記菌糸体熱水抽出液を得る際に残留する菌糸体残渣のアルカリ溶液抽出液とを混合して得られる混合液の陰イオン交換樹脂吸着画分であって、（a）フェノール硫酸法によるグルコース換算値としての糖質含量が 6 0 ～ 7 2 % であり、（b）銅フォリン法によるアルブミン換算値としてのタンパク質含量が 2 8 ～ 4 0 % である前記陰イオン交換樹脂吸着画分を含有する。

【選択図】 なし



特2002-04702.1

## 認定・付加情報

特許出願の番号	特願2002-047021
受付番号	50200249475
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成14年 3月20日

### <認定情報・付加情報>

【提出日】	平成14年 2月22日
-------	-------------

次頁無

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000001100]

1. 変更年月日

1990年 8月28日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中央区日本橋堀留町1丁目9番11号

氏 名

呉羽化学工業株式会社